

All'egregio prof. P. Jona
Omaggio

Istituto anat.-patol. di Palermo, diretto dal prof. S. Sirena

SULL'AZIONE DI TALUNI MICRORGANISMI NEI PESCI

RICERCHE

dei Dottori B. PERNICE e G. POLLACI

(Estratto dalla *Riforma Medica*, n. 206-207, Settembre 1892)

NAPOLI
TIPOGRAFIA DELLA RIFORMA MEDICA
Salita Pontecorvo, n. 60

1892

Istituto anat.-patol. di Palermo, diretto dal prof. S. Sirena

SULL'AZIONE DI TALUNI MICRORGANISMI NEI PESCI

RICERCHE

dei Dottori B. PERNICE e G. POLLACI

(Estratto dalla *Riforma Medica*, n. 206-207, Settembre 1892)

NAPOLI
TIPOGRAFIA DELLA RIFORMA MEDICA
Salita Pontecorvo, n. 60

—
1892

Le ricerche di laboratorio e le osservazioni raccolte nelle epidemie dell'uomo e degli animali superiori, se da una parte dimostrano che varie circostanze esteriori, specie la temperatura e la umidità possono influenzare di una maniera più o meno potente l'attività dei germi-contagi, dall'altra ci dan fondamento di credere che lo sviluppo dei varî microrganismi è in rapporto diretto con la composizione dei mezzi recettori. E nell'etiologia dei morbi infettivi bisogna tenere in gran conto lo stato dell'organismo invaso dai germi eccitatori di essi, il quale offre certe condizioni favorevoli o non al loro sviluppo, che costituiscono ciò che oggi s'intende in patologia per recettività o per immunità dei soggetti.

Lo studio epidemiologico riguarda affatto gli animali superiori e fa vedere chiaramente che le malattie trasmissibili, come il carbonchio, la morva, la sifilide, etc., non sono suscettibili di svilupparsi che in certe specie ed in certi individui, i quali rappresentano tanti mezzi differenti, in cui periscono o possono godere vita più o meno attiva i varî agenti infettivi. Le ricerche sperimentali

hanno confermato lo stesso principio per buon numero di batterî, i quali presentano delle particolarità nel loro sviluppo a seconda i diversi substrati nutritivi, e mentre riescono patogeni per taluni animali non lo sono per altri e viceversa; ma queste ricerche la più parte, e a ragione, sono state eseguite sempre negli animali a sangue caldo; in quelli a temperatura incostante solamente ci è nota qualche osservazione nei batraci.

Ora ricercare quale azione esercitano nei pesci taluni microbi, dei quali si conosce il valore patogeno o non patogeno nei mammiferi, ci è parso argomento degno di studio: esso ha lo scopo di accertare sempre più la biologia dei batterî adoperati, studiando la loro vitalità e le alterazioni, locali e generali, causate dietro la loro influenza in animali che presentano molte condizioni differenti di vita dei mammiferi; serve pure a dimostrare se animali a temperatura incostante reagiscono differentemente, che quelli a sangue caldo, alla eccitazione prodotta dai varî microrganismi.

Nei pesci le condizioni di temperatura animale, l'ambiente in cui essi vivono, la composizione dei loro tessuti (1), la quantità

(1) Composizione della carne dei mammiferi e delle carpe (Molescott):

Mammiferi: albumina 2,17, muscolina 15,25, tessuto connettivo 3,16, grasso 3,72, acqua 72,87, ceneri 1,14.

Carpe (della famiglia dei cyprinidi): albumina 2,93, muscolina 10,21, tessuto connettivo 2,02, grasso 2,84, acqua 78,54, ceneri 2,00.

dei liquidi organici, etc., è tutto un complesso di fatti, esteriori ed interiori, i quali fanno presupporre che debbono aversi delle modificazioni negli effetti causati dai batteri, patogeni o non patogeni per gli animali a temperatura costante, e ciò era utile conoscere sperimentalmente in un periodo in cui gli osservatori si studiano di dimostrare quali siano i fattori della immunità innata ed acquisita, e quando pare risulti da parecchie ricerche che la recettività dei soggetti o la

La carne di bue contiene: azoto 3, carbonio ed equivalente idrogeno 11.

La carne di carpa: azoto 3,49, carbonio ed equivalente idrogeno 12,40. (A. Gautier. *Chimie appliquée à la phys. à la path. et à l'Hyg.* V. I.)

Da un'analisi di von Bibra.

	Bue giov.	Rana	Carpa
Fibre muscolari ecc.	14,94	11,67	9,42
Album. solub. ed emogl.	1,29	1,86	1,38
Materie collogene	5,71	2,48	2,13
Materie estrattive	»	3,46	4,36
Acqua	78,06	80,43	82,17
Grassi	5,71	0,10	0,54

(Rochard. *Encyclopedie d'Hyg.* T. II, 1890).

La carne dei mammiferi contiene 31,59 % di colla, quella dei pesci ne contiene il 43,89 % (Moleschott). Eulenburg V. II.

Su 1000 parti di sangue: globuli 124 a 129 p. nel cane, 55 a 69 nella rana, 82 nella carpa.

Su 1000 parti di siero: acqua 918 nel cane, 950 nella rana, 900 nella carpa. (Gautier. *Loco cit.* pag. 534).

Il processo di Vierordt dà le cifre per il valore relativo dell'emoglobina nel sangue dei differenti vertebrati: quello dei pesci sta sotto di quello dei rettili e degli anfibi. (H. Beaunis, Vol. I, pag. 305).

loro refrattarietà sia principalmente in rapporto con la composizione chimica dell'organismo.

Se nello stato anatomico dei vari organi son note le varie differenze che distinguono i pesci dagli altri vertebrati, se nelle condizioni interne, intime dei tessuti, è possibile si abbiano pure talune differenze chimiche ed anatomiche, le condizioni esterne, la temperatura, la umidità, il mezzo in cui vivono, etc. è chiaro per i pesci, non sono le stesse degli animali a sangue caldo.

Sappiamo che gli animali a sangue freddo hanno una temperatura propria, ma essa oscilla in limiti molto estesi e segue presso a poco le variazioni di temperatura del mezzo ambiente; per cui van detti meglio animali a temperatura variabile; mentre d'altra parte sappiamo ancora che la temperatura necessaria per lo sviluppo degli schizomiceti varia sì per le diverse specie di essi, ma è in generale, sempre superiore a quella necessaria per lo sviluppo delle muffe, compresa tra 20° e 35°, più vicina alla temperatura del corpo umano, specie per certi batteri, come quelli del carbonchio e della tubercolosi. Son note in proposito le esperienze fatte per dimostrare l'influenza della temperatura animale nello sviluppo del carbonchio. Pasteur raffreddando il pollo tenendolo parzialmente nell'acqua a 25° fece ad esso contrarre il carbonchio, Gibier diede il carbonchio a delle rane ed a dei pesci che aveva fatto vivere in un'acqua portata alla temperatura di 35° (1).

(1) Cornil et Babes.—Les bacteries.

Ma nonostante il fatto sia accertato, crediamo non si possa veramente stabilire se esso debbasi attribuire con sicurezza direttamente alle mutate condizioni di temperatura, o che queste determinino nell'organismo altre condizioni che fanno perdere la immunità agli animali, quando vediamo dei polli, eccezionalmente è vero, prendere il carbonchio senza essere raffreddati, e che i passerì con temperatura elevata, sono sensibili a questo microrganismo.

Le esperienze di Canalis e Morpurgo sull'influenza del digiuno nella disposizione alle malattie infettive (1), e quelle fatte nel nostro laboratorio sugli animali privati dell'acqua (2) concordano in questo concetto, perchè in queste esperienze polli e piccioni, naturalmente refrattari al carbonchio, prendevano la infezione quando nei polli tenuti a digiuno l'abbassamento di temperatura maggiore fu di due gradi e mezzo (Canalis e Morpurgo), ciò che non basta secondo Colin a togliere loro la immunità al carbonchio (3), e nella esperienza sulla sete (Pernice e Alessi) poca o nessuna variazione di temperatura avveniva nei polli e nei piccioni privati dell'acqua che perdevano l'immunità al carbonchio.

E noi, tenendo presente tale questione sulla influenza della temperatura, premettiamo di avere sperimentato nei pesci nel tempo

(1) Roma — Tipografia delle Mantellate 1890.

(2) B. Pernice e S. Alessi. — *La Riforma Medica* nn. 220-221; 1891.

(3) *Bullet. de l'Acad. de mèd.* 1878.

delle basse temperature, dalla fine di settembre a marzo..

Di infezioni, di ricerche batteriologiche nei pesci poche conoscenze abbiamo che possano, pure indirettamente, avere rapporto col nostro lavoro.

Ch. Richet (1) ha riconosciuto l'esistenza di microrganismi appartenenti a delle specie diversissime negli animali marini, i quali si trovano in un ambiente favorevole alla loro vita, ciò che risultò provato in seguito da parecchi osservatori; di che anche in questo laboratorio furono fatte ricerche, sulla esistenza di batteri anche patogeni nell'acqua di mare (la casa di Palermo) (2), sulla vitalità di taluni microbi in essa (3), e sulla resistenza vitale del bacillo virgola (S. Sirena) (4). C. Flüge (5) riferisce che nei pesci si è osservata una infezione prodotta da un fungo (saprolegna); de Giava (6) fece una serie di osservazioni sul modo di comportarsi di alcuni microrganismi patogeni nell'acqua di mare, in Napoli, e cercò di vedere se i pesci inducessero l'infezione portando i germi depositati alla loro superficie

(1) *Soc. de biol.* 11 nov. 1882.

(2) S. Sirena e B. Pernice. — L'acqua della Cala di Palermo dal lato batterioscopico. *Bollett. della Società d'igiene di Palermo* 1886.

(3) — Ancora sull'acqua della Cala di Palermo *id.* 1886 pag. 361.

(4) — Atti del Congresso di Igiene in Brescia 1888. V. I. pag. 158. *La Sicilia medica* 1889. pag. 944 e seg.

(5) I microrganismi.

(6) *Zeitschrift f. Hygiene.* Sec. Band. 1889.

o che i medesimi (b. del carbonchio, b. del colera) venissero eliminati per il tratto intestinale. Ma delle difficoltà insuperabili fecero limitare l'autore a vedere soltanto se i microrganismi ingoiati si conservassero viventi nel tubo digerente, e venissero eliminati con le deiezioni; e da queste ricerche risultò che quasi sempre l'attività dello stomaco e degli intestini uccide i bacilli del colera e quelli del carbonchio.

Con intendimento del tutto differente e che di sopra è esposto, per istudiare come si comportano taluni batteri nei pesci quale substrato nutritivo, noi abbiamo fatto le nostre ricerche adoperando il b. del carbonchio, quello del pus verde e quello della tubercolosi, il micrococco prodigioso e la sarcina lutea. Iniziammo le nostre esperienze in pesci d'acqua di mare, ma molte circostanze sfavorevoli ci obbligarono a smettere di lavorare in essi; quindi esperimentammo in pesci d'acqua dolce, nei pesci esotici della famiglia dei cyprinidi, nella varietà rossa (*cyprinus auratus*), che è qui facile a trovarsi e che si tiene come ornamento nelle vasche dei giardini e in vasi di cristallo.

Le iniezioni di culture pure venivano fatte per lo più in una della parti laterali del corpo, infiggendo l'ago della siringa di Tursini al disotto delle squame obliquamente al disopra della coda, ed iniettando d'ordinario $\frac{1}{2}$ c.c. per ognuno dei pesci grossi (ciascuno del peso di grammi 35 a 40) e $\frac{1}{4}$ di c.c. in quelli piccoli del peso di 10 a 15 gram. l'uno; del bacillo della tubercolosi la cultura fu i-

niettata quattro volte dentro la cavità addominale; e quattro (poche gocce) in un occhio degli animali, i quali tutti, nel periodo di esperimento, erano tenuti isolati in vasi grandi di cristallo, in cui giorno per giorno si cambiava l'acqua.

Riportiamo qui appresso i risultati delle fatte osservazioni (1).

Osservazioni con il bacillo del carbonchio.

Pesce n. 1. — Il 23 settembre 1891 facemmo una iniezione ipodermica di $\frac{1}{2}$ cmc. di cultura in brodo di bacillo del carbonchio nella superficie laterale destra del corpo.

Nei primi tre giorni di osservazione l'animale non mostrò alcuna alterazione apprezzabile nel luogo dello innesto, al quinto giorno vi notammo un leggero sollevamento delle squame per la estensione quasi di una moneta di un centesimo; le squame allora erano poco aderenti e talune si lasciavano asportare facilmente con l'ansa di platino, ed al disotto di esse si notava la presenza di un essudato bianchiccio poco tenace, e tutta la lesione era circondata come da un anello rosso per intensa iperemia dei tessuti. Nei giorni successivi, calute le squame, la lesione si estese un pò più in superficie e divenne profonda, assumendo i caratteri di una vera ulcerazione; dal quinto giorno in poi facemmo periodicamente ricerche batteriolo-

(1) I risultati delle presenti ricerche furono da noi comunicati al IV. congresso della federazione delle Società italiane d'igiene (1892) nella seduta p. m. del 17 maggio.

giche per mezzo di preparati secchi con l'essudato della ulcerazione e per mezzo delle culture, tali ricerche riuscirono positive in quanto alla esistenza dei bacilli del carbonchio, fino al quindicesimo giorno di osservazione. Però mentre nei primi giorni i bacilli erano abbondanti (preparati secchi) e si vedevano lunghi filamenti, in seguito, dal settimo giorno in poi, cominciarono a diminuire di numero, e si vedevano delle forme pallide, poco colorate, talune granulose, come forme regressive. La lesione esterna modificò i suoi caratteri col diminuire dei bacilli; difatti al tredicesimo giorno era alquanto rimpicciolita, l'alone iperemico era quasi scomparso e l'essudato in iscarsa quantità. Al diciottesimo giorno l'animale venne tolto di osservazione, e riesaminato il 9 dicembre la regione ulcerata la si trovò del tutto cicatrizzata e le squame eransi riprodotte.

Pesce n. 2.—Inoculato come il precedente e con la stessa data.

Nei primi tre giorni non mostrò nulla di anormale; al quarto apparve nel sito della iniezione una lesione come quella del pesce n. 1, ed il giorno successivo nei preparati secchi dello essudato della ulcerazione vedemmo qualche raro bacillo del carbonchio, ma le culture diedero risultato negativo. Nei giorni successivi la lesione restò immutata nei suoi caratteri, ma le ricerche batteriologiche riuscirono costantemente negative; il 15 ottobre sulla superficie laterale destra del corpo, dal punto della inoculazione sino alla coda trovammo che le squame erano divenute scolorate, molte si lasciavano staccare

facilmente al minimo tocco, restando per buona parte i tessuti denudati, l'alone rosso circondante la lesione primitiva era scomparso, ma questa persisteva, come ulcerazione. Successivamente l'animale peggiorò, quasi tutta la superficie destra del corpo restò spoglia di squame, ed i tessuti denudati erano coperti di essudato bianchiccio, con punti emorragici nella base della coda, ed il 23 ottobre fu trovato morto.

Le ricerche del bacillo del carbonchio nei tessuti adiacenti alla lesione riuscirono positive, quelle fatte nel sangue del cuore e nella bile negative; l'essudato della superficie esterna si trovò ricco di micrococchi.

Pesce n. 3.—Morì il 6 ottobre 1891 ventiquattr'ore dopo una iniezione ipodermica di $\frac{1}{2}$ cmc. di cultura di carbonchio. Nel cadavere notammo sollevamento delle squame circoscritto al punto dove cadde l'iniezione ed emorragie nelle branchie. Le ricerche dei bacilli inoculati riuscirono positive non solamente nei tessuti adiacenti al punto di iniezione, ma pure nel peritoneo, nel fegato, nel sangue del cuore.

Pesce n. 4.—Venne messo in osservazione il 5 ottobre 1891 come l'animale precedente. Nel giorno seguente all'inoculazione notammo un leggero sollevamento delle squame che presero un colorito più oscuro che le rimanenti del corpo, ciò che divenne maggiormente manifesto nei giorni seguenti, ed al quinto si lasciarono asportare facilmente, mostrandosi i tessuti sottostanti coperti da pochissima quantità di essudato bianchiccio, nel quale trovammo bacilli del carbonchio

fino al 10° giorno di esperienza. Il 19 dello stesso mese l'animale venne tolto d'osservazione, perchè la lesione era quasi guarita.

Pesce n. 5.—Inoculato con poche gocce di cultura il 19 ottobre 1891 fu tenuto in osservazione fino al 4 dicembre. Presentò dal 5° giorno in poi lo stesso sollevamento di squame, la stessa lesione di continuo che gli altri animali, ma non potemmo accertare la esistenza di bacilli del carbonchio nella lesione esterna, la quale in ultimo guarì restando in sito una cicatrice di colorito oscuro.

Pesce n. 6.—Inoculato come il precedente non presentò che un leggero sollevamento delle squame nel sito della iniezione, ma niente altro degno di nota.

Pesce n. 7)
Pesce n. 8) .— Vennero messi in osservazione il 1° febbraio 1892, inoculato nella parte laterale sinistra del corpo di ciascuno $\frac{1}{2}$ cc. di cultura in brodo di carbonchio.

Si tennero in osservazione 24 giorni a capo dei quali uno si trovò morto; durante tale periodo non mostrarono alcuna lesione apprezzabile, e le ricerche dei bacilli fatte nel punto della iniezione riuscirono sempre negative, come pure negli organi interni dello animale morto.

Pesce n. 9)
Pesce n. 10) .—Piccoli, nati da poche settimane, del peso ciascuno di 5 grammi, vennero inoculati il 26 febbraio 1892, iniettando poche gocce di cultura. Uno di essi fu trovato morto il giorno successivo, senza lesione apprezzabile negli organi interni, dando pure

risultato negativo per la ricerca dei batteri, l'altro fu tenuto in osservazione per 36 giorni, durante i quali solamente al 5° giorno si riscontrarono bacilli nel luogo della iniezione; sacrificato il 3 aprile niente si trovò degno di nota.

Pesce n. 11 }
 Pesce n. 12 } . — Entrambi animali grossi, vennero inoculati il 26 febbraio 1892 con 1 cc. di cultura, e tenuti poscia in osservazione per 36 giorni, durante il quale periodo non presentarono fatti importanti; si comportarono quasi come il pesce n. 10.

—
 In tutti questi animali tenuti in esperimento, l'acqua dei recipienti avemmo cura di cambiare giornalmente; ma in seguito volemmo vedere nel pesce seguente se il non rinnovare l'acqua potesse essere causa di diminuire negli animali la resistenza alla infezione.

Pesce n. 13.—Venne inoculato con $\frac{1}{2}$ cmc. di cultura e tenuto dentro un recipiente della capacità di $\frac{1}{2}$ litro in cui l'acqua non fu rinnovata affatto durante la osservazione, la quale durò 10 giorni, in capo dei quali l'animale si trovò morto. Nessun fatto risultò degno di speciale nota nello esperimento di questo pesce; la ricerca dei bacilli fu sempre negativa.

Un altro animale (controllo) dello stesso peso e messo nelle stesse condizioni del pesce n. 13, ma non inoculato, visse sei giorni più di questo.

—
 Dalle osservazioni fatte nei 13 pesci dora-

ti, inoculati di carbonchio, si ricava: che due animali, di cui uno piccolo, morirono in 24 ore, sei non presentarono alcuna lesione localmente, nè, durante vita, esistenza del microrganismo adoperato; in alcuni si ebbe nei giorni seguenti alla inoculazione locale sollevamento di squame ed iperemia; in due solamente al 4° giorno lo stesso sollevamento, iperemia, e poi caduta delle squame e formazione di un'ulcera che durò fino al 14°-15° giorno, coperta di essudato bianchiccio, e con esistenza di bacilli del carbonchio fino a quella epoca, nell'uno, nell'altro, ai dintorni della lesione, fino alla morte dell'animale, che avvenne dopo un mese. Un animale inoculato, e tenuto in un vaso piccolo, senza rinnovare mai l'acqua, morì al 10° giorno, ma non riscontrammo bacilli nè sul luogo della iniezione, nè negli organi interni, mentre il controllo (non inoculato) morì pure, ma 6 giorni dopo del primo.

Osservazioni con il bacillo piociano.

Pesce n. 14.—Venne messo l'animale in osservazione il 4 dicembre 1891, iniettando nella parte laterale sinistra del corpo $\frac{1}{2}$ cmc. di cultura in brodo di bacillo piociano. Il giorno 7 dello stesso mese si trovò in fin di vita, e, sacrificato, nulla di notevole osservammo negli organi interni, e nei tessuti dove cadde l'iniezione, tranne quivi un leggero grado di iperemia dei tessuti. Le ricerche del microrganismo adoperato, fatte, per mezzo di culture nel punto di iniezione, nei tessuti vicini, e nel sangue del cuore, riuscirono positive.

Pesce n. 15.—Inoculato come l'animale n. 14, e nello stesso giorno, fu trovato morto 48 ore dopo, dando all'esame del cadavere gli stessi risultati del precedente.

Pesce n. 16.—Fu inoculato il 9 dicembre 1891. Nei primi giorni stette apparentemente bene; al quarto, nel luogo della iniezione, notammo un leggiero sollevamento delle squame, al disotto delle quali c'era essudato bianchiccio commisto a sangue; al quinto dalla lesione ricavammo culture positive di bacillo piociano, e culture positive ottenemmo sempre dalla lesione e dall'acqua dove viveva l'animale, pure cambiata ogni giorno, fino al 21° giorno di osservazione, in cui l'animale si trovò morto. Negli ultimi giorni di vita il colorito esterno dell'animale andò cambiando e da giallo-oro che era, divenne, due giorni prima della morte, verde-scuro. La lesione esterna persistette fino alla morte, anzi negli ultimi giorni era peggiorata: nel punto della iniezione, oltre alla perdita delle squame ed allo essudato c'era una viva iniezione periferica, ed in centro un piccolo orificio di un condotto che portava in una cavità, dalla quale l'ago di platino traeva fuori del liquido torbido ed una membranella grigio-biancastra, che l'esame istologico dimostrò essere costituita di fibrina, numerosi corpuscoli purulenti, e globuli di sangue e granuli grassi; i contorni dell'orificio anale erano e si mantennero tumidi e fortemente arrossati. Nel cadavere trovammo: una cavità ascessuale quanto un piccolo cece comunicante allo esterno per il condotto sopra notato, circondata da tessuti fortemente arrossati, e con-

tenente essudato giallo-rossiccio, costituito (esame istologico) di globuli rossi, globuli purulenti e granuli grassi; nella cavità addominale trovammo forte iperemia, specie nel retto, tumefatto fino all'ano. Gl'innesti fatti dal sangue del cuore, dalla lesione esterna, dalla cavità ascessuale, dai muscoli arrossati e dallo intestino, riuscirono tutti positivi.

Pesce n. 17.—Venne inoculato lo stesso giorno come l'animale precedente. Nei primi tre giorni di osservazione non offrì nulla di particolare; al quarto nel sito della iniezione si formò un leggero sollevamento delle squame, e al disotto di esse osservammo un poco di essudato bianchiccio; questa lesione andò in seguito mano mano aggravandosi, tanto che al diciottesimo giorno si notava una vera ulcerazione a fondo bianco-grigiastro e con contorni fortemente arrossati, e l'essudato era costituito (esame istologico) in massima parte di globuli purulenti, fibrina ed emazie. Dal quarto giorno di esperimento cominciammo a fare ricerche con culture dalla lesione e dall'acqua dove viveva l'animale 24 ore, ricerche che riuscirono sempre positive fino al 50° giorno. In seguito, persistendo ancora la lesione anatomica, l'esame batterioscopico di essa e dell'acqua riuscì negativo fino alla morte dell'animale che avvenne al 59° giorno. Negli ultimi giorni di vita il colorito esterno era divenuto, da giallo-oro che era, leggermente verdastro. L'esame degli organi interni del cadavere e gl'innesti fatti da essi e dalla lesione esterna riuscirono negativi.

Pesce n. 18. — Messo in osservazione il 21 dicembre 1891, al terzo giorno nel punto di

iniezione si notò un leggero sollevamento delle squame, che si accentuò nei giorni successivi, formandosi una certa quantità di essudato al disotto di esse, essudato bianco-grigiastro, istologicamente costituito di cellule purulente e granulazioni adipose. Dal quarto giorno cominciammo a fare culture e del materiale della lesione e dell'acqua, dove si trovava l'animale, e che veniva rinnovata giornalmente. Le culture riuscirono positive fino al diciottesimo giorno di osservazione; d'allora in poi risultarono sempre negative; la lesione esterna andò riparandosi, ed in seguito cicatrizzò del tutto.

Pesce n. 19.—Questo animale, inoculato lo stesso giorno che il precedente, diede all'osservazione quasi gli stessi fatti di quello.

Riepilogando i risultati di queste osservazioni, abbiamo: che di sei animali inoculati con il bacillo piociano, due morirono presto, uno dopo 48 ore e l'altro dopo 3 giorni, e le culture riuscirono positive nei tessuti e nel sangue del cuore; ma localmente non si ebbe lesione apprezzabile; in tutti gli altri si formò una lesione ulcerosa dal 3° al 4° giorno, con essudato bianco-grigiastro, ricco di cellule purulente, granuli grassi e batteri.

Due di questi animali guarirono, e le culture ricavate dalla lesione, furono positive fino al 18° giorno, anche dall'acqua del vase, e da questo giorno, tanto nella lesione, quanto nell'acqua (che veniva rinnovata giornalmente) scomparve il bacillo inoculato; in uno si formò prima un ascessolino e poi, rotto questo, un'ulcera, che durò fino al 21° gior-

no, quando l'animale morì, e dal cadavere si ricavarono culture positive dalla lesione e dai tessuti circostanti e dal sangue del cuore; l'ultimo morì al 59° giorno d'osservazione e fino a 50 giorni durava l'ulcerazione con esudato fibrino-purulento, e si ricavarono culture di bacilli dalla lesione e dall'acqua. In due animali, terzo e quarto di queste osservazioni, giorni prima di morire il colorito esterno si cambiò da giallo-oro che era in verde.

Volendo conoscere quanto durasse in vita il bacillo piociano nell'acqua, nella quale si tenevano i pesci, abbiamo messo in un recipiente dell'acqua, nella quale erasi tenuto per 24 ore un pesce infetto e con ulcera. Dalle ricerche fatte, per mezzo di culture, in tale acqua inquinata risultò che il bacillo piociano restava in vita per due giorni, e poi periva, fatto che venne più volte riconfermato.

Dippiù, volemmo conoscere se le culture di bacillo piociano ricavate dai pesci conservassero la loro virulenza per le cavie, e, da esperimenti fatti con tale intendimento, risultò che il bacillo piociano ricavato sino a 42 giorni dalla lesione ulcerosa dei pesci infetti, riuscì sempre virulento per le cavie, ma la morte di questi animali avvenne più o meno con ritardo che quando si inoculavano le culture iniziali.

Osservazioni con il bacillo della tubercolosi.

Con culture di bacilli tubercolari inoculammo otto pesci.

(Pesce n. 20-pesce n. 27.): in quattro di es-

si iniettammo per ciascuno $\frac{1}{2}$ c. c. di cultura nella cavità addominale, negli altri quattro poche gocce in uno degli occhi.

Tutti e otto gli animali non presentarono durante il lungo periodo di osservazione, niente di anormale; li abbiamo sacrificati metà dopo 60 giorni, e metà dopo 90 giorni; l'esame istologico e delle culture fu negativo. Ciò nonostante, con una specie di emulsione, fatta dagli organi contenuti nella cavità addominale degli animali nei quali l'infezione batterica era stata intra-addominale, facemmo delle inoculazioni nelle cavia, le quali vissero bene per due mesi e che da noi sacrificate, non presentarono alcun segno di tubercolosi.

Osservazioni con il micrococco prodigioso.

Pesce n. 28.— Il 5 Gennaio 1892 iniettammo nella parte laterale destra del corpo $\frac{1}{2}$ c. c. di cultura in brodo di micrococco prodigioso; al secondo giorno l'animale fu trovato morto e potemmo ricavare culture positive solamente dal luogo della puntura.

Pesce n. 29.— Inoculato come il precedente e nello stesso giorno.

L'animale si mostrò apparentemente sano nei primi cinque giorni di osservazione; al sesto, nel luogo della iniezione, cominciò un piccolo sollevamento delle squame, che si fece più spiccato nei giorni seguenti, ed al disotto di esse cominciò a vedersi essudato bianchiccio. All'undicesimo giorno erasi costituita una vera ulcerazione della grandezza di una lenticchia, col fondo ricoperto di abbondante essudato, che, esaminato al micro-

scopio, risultò formato di numerosi globuli purulenti ed emazie. Dal sesto giorno dalla inoculazione cominciammo a fare innesti su patate e dal materiale della lesione e dall'acqua, prima che venisse ogni giorno rinnovata, e tali innesti riuscirono costantemente positivi sino al 13° giorno, con questa differenza, che mentre dalla lesione si aveva abbondantissimo sviluppo di prodigioso, negli innesti fatti con l'acqua si vedevano rare colonie di esso. L'animale il quattordicesimo giorno si trovò morto.

La lesione esterna conservava i caratteri di sopra notati; nella cavità del peritoneo c'era liquido sanguinolento, iperemia della sierosa, tumefazione degli intestini fino al contorno anale; il liquido intraddominale risultava costituito di globuli rossi, molti globuli purulenti e corpi granulosi.

Gli innesti fatti dalla lesione, dall'essudato peritoneale e dal sangue del cuore riuscirono tutti positivi.

Pesce n. 30.—Messo in esperimento il giorno 11 Gennaio 1892. Al secondo giorno dalla iniezione, nella coda e nella pinna anale e dorsale e nelle parti laterali del corpo si videro formate delle piccole macchiette di colorito rosso, col materiale delle quali si ricavarono culture, ricchissime di micrococco prodigioso. Nel sito della puntura si costituì la lesione notata nell'animale precedente, che si iniziò al 3° giorno e che al 9° aveva il suo pieno sviluppo in una ulcerazione della grandezza di un piccolo pisello con fondo ricoperto di essudato bianco-grigiastro, poco tenace, ricco (esame istologico) di globuli pu-

rulenti, granuli grassi e globuli rossi. Al quarto giorno i punticini rossi nelle parti laterali del corpo scomparvero, ma persistettero quelli della coda e della pinna anale fino al quindicesimo. Dal quarto al trentesimo giorno di osservazione gli innesti fatti con l'essudato e con l'acqua riuscirono sempre positivi, con la differenza che le colonie nelle culture della lesione erano abbondantissime, scarse in quelle dell'acqua.

Dal 31° giorno in poi le culture riuscirono negative; due giorni dopo l'animale si trovò morto. Nel cadavere, nessuna lesione apprezzabile riscontrammo negli organi interni, nella superficie esterna persisteva l'ulcerazione. Facemmo delle culture dalla lesione esterna, dal liquido della cavità peritoneale, e dal sangue del cuore, e riuscirono positive quelle del sangue e del liquido addominale.

Pesce n. 30.—Inoculato come il precedente, e con la stessa data. Al sesto giorno d'osservazione le squame, nel punto di iniezione, erano meno tenaci; nei giorni successivi si formò una piccola ulcerazione, ed il materiale raccolto sulla superficie di essa conteneva cellule purulente ed elementi epiteliali con degenerazione grassa. Dal 4° giorno in poi si fecero periodicamente culture dalla lesione e dall'acqua del recipiente, le quali nei primi due giorni risultarono negative, e poscia ora positive ora negative, fino al 54° giorno, dopo il qual tempo furono sempre negative.

Allo 86° giorno di esperimento si sacrificò l'animale, e le ricerche del micrococco pro-

digioso furono negative in tutti gli organi del cadavere.

Pesce n. 32.—Venne messo in esperimento il 2 Marzo 1892.

Il liquido iniettato restò raccolto fra lo strato muscolare ed il rivestimento cutaneo, formandosi una bozza, grossa quanto una nocciuola, la quale restò quasi delle stesse dimensioni per sedici giorni. In seguito si formò una perdita di sostanza larga quanto una lenticchia, dalla quale si penetrava in una cavità, ampia quanto la superficie di una moneta di due centesimi, e sul cui fondo si vedeva lo strato muscolare fortemente iperemico, coperto di essudato bianco-sporco, costituito istologicamente di cellule purulente, globuli rossi, epiteli con degenerazione grassa e granulazioni adipose libere. I tessuti esterni, corrispondenti a questa specie di tasca purulenta, erano completamente staccati dallo strato muscolare, e costituivano la parete esterna della cavità ascessuale; le squame corrispondenti erano scolorate e cadevano al minimo tocco, qua e là si notavano delle piccole emorragie. Quattro giorni dopo, queste lesioni si trasformarono tutte in una vasta ulcerazione, con fondo fortemente arrossato, coperto da chiazze di essudato, con margini mollicci, che sanguinavano facilmente. Le ricerche del micrococco prodigioso riuscirono positive nell'ulcerazione per 27 giorni, in seguito furono negative. Sacrificato l'animale al 32° giorno di esperimento, quando l'ulcerazione era in via di riparazione, nulla riscontrammo negli organi interni, e le ricerche batteriologiche furono negative.

Pesce n. 33. — Inoculato come il precedente e con la stessa data. Nei primi quattro giorni esso non presentò nulla di anormale; al quinto, cominciò la solita lesione, che poscia pigliò i caratteri di vera ulcera, dando il solito reperto istologico dell'essudato, come negli animali precedenti. Le ricerche del micrococco prodigioso nell'essudato furono positive fino a diciannove giorni, poi risultarono sempre negative come pure negli organi dell'animale, che sacrificammo al 32° giorno di osservazione.

Col micrococco prodigioso dunque inoculammo sei animali, dei quali uno morì al secondo giorno; negli altri si formò localmente, dal 4° al 6° giorno, una ulcerazione, in taluni prima un ascessolino. Di questi ultimi pesci, uno morì dopo 14 giorni, ed un altro dopo 33 giorni, ed in entrambi ottenemmo culture positive del microrganismo adoperato tanto dall'essudato dell'ulcera, quanto dal liquido addominale, e dal sangue del cuore. Gli altri animali sopravvissero, ma diedero culture positive di micrococco prodigioso, uno per 19 giorni, il secondo per 27, il terzo per 55 giorni, e l'ulcera ebbe sempre gli stessi caratteri con essudato fibrino-purulento.

Anche per il micrococco prodigioso volemmo vedere quanto tempo esso durava in vita nell'acqua, che aveva contenuto per 24 ore gli animali in esperimento, e, preparate le cose come di sopra è detto a proposito del bacillo piociano, ci risultò pure che il mi-

crocooco prodigioso periva nell'acqua dopo il secondo giorno.

Dippiù, volemmo pur vedere se il micrococco prodigioso, coltivato nel pesce, diventasse patogeno per le cavia, ma i risultati furono che detto microrganismo, ricavato dai pesci, anche dal sangue del cuore di animali morti per la infezione, niente produceva apparentemente nelle cavia; abbiamo è vero veduto una sola cavia morire al 12° giorno dalla inoculazione, ma tranne che nel cellulare sotto-cutaneo del luogo della iniezione, in nessuno altro organo fu accertata la presenza del microrganismo adoperato.

Osservazioni con la sarcina lutea.

Un altro dei microrganismi non patogeni per gli animali a sangue caldo, la cui azione volemmo studiare nei pesci, fu la sarcina lutea. Con culture in brodo nella quantità da $\frac{1}{2}$ a 1 c.c. inoculammo sei animali sempre iniettando il liquido nello spessore del corpo in uno dei lati di questo. Gli animali tutti non presentarono, durante il periodo di osservazione, fatti locali nè generali apprezzabili degni di nota, nemmeno sollevamento di squame nel punto della iniezione; non ci fu dato di potere ricavare mai culture dal luogo di inoculazione nè dagli organi interni, avendo sacrificato metà di animali a periodi differenti. Il rimanente di questi dopo trenta giorni di risultato negativo vennero tolti di osservazione.

CONCLUSIONI.

Dalle ricerche sopra esposte possiamo rica-

vare i seguenti fatti intorno all'azione esercitata da taluni batterî nei pesci:

Nel pesce dorato d'acqua dolce (*cyprinus auratus*):

1. In 13 esperimenti, dietro l'iniezione di cultura di bacilli del carbonchio, due volte si ebbe una lesione spiccata ulcerosa nel punto d'innesto, con morte dell'animale una volta; in cinque casi i pesci inoculati morirono, e la morte avvenne due volte in 24 ore, e le altre 10-24-30 giorni dopo l'iniezione, ma in due di essi solamente dagli organi si ricavarono culture di bacilli del carbonchio; negli altri esperimenti o non si ebbero affatto segni apprezzabili di lesioni, o fatti di poco rilievo, e gli animali sopravvissero sempre all'inoculazione.

2. Il bacillo piociano riuscì sempre patogeno, causando suppurazione ed ulcerazione localmente, e talune volte (4 in 6), per l'infezione, la morte degli animali, avvenuta 48 ore, 3-21-59 giorni dopo l'innesto, e con mutamento del colorito esterno due volte da giallo-oro in verde; la lesione ulcerosa si formò dal 3° al 4° giorno dalla inoculazione, e il bacillo piociano durò in essa per 18-21-50 giorni, conservando la sua virulenza per le cavie, ciò che risultò provato fino al 42° giorno.

3. Il micrococco prodigioso riuscì sempre patogeno, causando un'ulcera nel sito da innesto, formatasi dal 4° al 6° giorno, inducendo nella metà dei casi (3 in 6) la morte degli animali 48 ore, 14-33 giorni dopo l'iniezione, con risultato positivo delle culture, fin dal sangue del cuore, e con segni di peritonite una volta; anche negli animali che soprav-

vissero all' inoculazione, nell' ulcera si conservò il micrococco prodigioso 19-27-55 giorni, ed esso ricavato con culture, come quello ottenuto dal sangue del cuore di animali morti, restò non patogeno per le cavie.

4. Il bacillo della tubercolosi non produsse nè lesione locale, nè infezione generale.

5. La sarcina lutea non produsse nè lesione locale, nè infezione generale.

6. Il micrococco prodigioso ed il bacillo piociano, coltivati ciascuno nell' ulcera degli animali in esperimento, si diffondevano nell' acqua in cui questi vivevano, ma in essa (allontanati i pesci infetti) si conservarono in vita solamente due giorni.

Questi risultati dimostrano che il *cyprinus auratus* rappresenta un buon substrato nutritivo tanto per il bacillo piociano, quanto per il micrococco prodigioso, patogeno l' uno e non patogeno l' altro per animali a sangue caldo; ed a ciò contribuirà prevalentemente la composizione dei tessuti dell' animale, in cui pure un microrganismo non patogeno per animali a temperatura costante trova condizioni favorevoli per la vita e per la moltiplicazione e produce lesione locale ed infezione generale, nonostante la temperatura variabile propria dei pesci: condizioni tutte che d' altro lato si oppongono, come si è visto, alla vita di altri batteri, quelli della tubercolosi e la sarcina lutea, di cui si conoscono le proprietà patogene dell' uno e non patogene dell' altra negli animali a temperatura costante.

Dagli stessi risultati si vede che il bacillo del carbonchio la più parte delle volte perisce

negli animali inoculati, ma qualche volta vi si moltiplica producendo anche lesione locale, ed eccezionalmente poi è causa d'infezione generale, poichè dei cinque casi di morte solamente in due il reperto batteriologico riuscì positivo. Ciò però ci sembra che basti sempre a dimostrare che la composizione dei tessuti non si oppone a che detto microrganismo vi vegeti. Ritenghiamo che la differenza di effetti causati nei pesci dal bacillo del carbonchio sia possibilmente dovuta alla variabilità di temperatura che questi animali presentano in relazione al vario stato di temperatura del mezzo ambiente, e che può, a seconda il grado, creare nel substrato nutritivo, che offre l'animale, condizioni tali da impedire, arrestare lo sviluppo dei bacilli, o agevolarne l'attività vitale. E questo ce lo fa ritenere l'osservazione che i casi positivi nelle inoculazioni di carbonchio li ottenemmo nelle prime esperienze, fatte in settembre e primi d'ottobre quando la temperatura ambiente non era inferiore ai 20°, mentre in seguito, nei mesi freddi con temperatura media 9°-12°, i risultati, e del maggior numero di osservazioni, fu negativo, nonostante si adoperassero sempre culture virulente ricavate da cavie carbonchiose; e ciò concorderebbe con il risultato sperimentale ottenuto da Gibier elevando la temperatura dell'acqua in cui vivevano le rane ed i pesci.

I risultati su esposti dimostrano altresì che non solamente il bacillo piociano, ma anche il micrococco prodigioso esercitano localmente azione piogene. La formazione dell'ulcera, trascorsi i primi giorni necessari per la mol-

tiplicazione dei germi, è un fatto degno di speciale importanza, perchè non lo vediamo negli animali a sangue caldo; e chè si avveri nei pesci è possibile contribuisca la conformazione anatomo - istologica dei tegumenti esterni propria di tali vertebrati, la compattezza dei tessuti, che forse giova a ritardare lo spandimento, la diffusione, lo assorbimento dei liquidi, contenenti microbî, iniettati, per cui si ha durata maggiore dell'azione locale, e tempo maggiore per la moltiplicazione dei germi, favorita dal riposo e dalle condizioni chimiche dei tessuti; ciò che rende possibile, sebbene l'osservammo raramente, la iniezione dei bacilli specifici, determinare il carbonchio con sintomi locali, avverandosi sperimentalmente qualche cosa lontana o di simile di quello che avviene nell'uomo, con la formazione della pustola maligna.

Dippiù, in sito, per la struttura anatomica istessa, con il fatto della penetrazione del liquido per la iniezione ipodermica, si ha maltrattamento dei tessuti, che costituisce una condizione occasionale, predisponente locale, favorevole perchè si avveri la lesione ulcerosa notata costantemente nelle iniezioni da micrococco prodigioso e da bacillo piociano e formatasi dopo un periodo di incubazione, e non formatasi affatto in alcun caso dietro innesto di altri batterî (b. della tubercolosi, sarcina lutea), o eccezionalmente come vedemmo per azione del bacillo del carbonchio; e questo vogliamo far rilevare, perchè venga eliminato il dubbio che causa della ulcerazione, possa essere solamente il traumatismo locale,

mentre per noi l'ulcera è l'effetto dell'azione microbica in terreno adatto anatomicamente ed in condizioni occasionalmente favorevoli.

Or, dimostrato il fatto che i pesci offrono un terreno favorevole per la vita di alcuni microbî e che possono anche ammalare e morire per azione batterica, non possiamo escludere la possibilità che, in certe condizioni di tempo e di luogo per mezzo di germi patogeni pervenuti nelle acque, trasportativi coi materiali di rifiuto dell'uomo e degli animali, e viventi in esse, possa avvenire infezione nei pesci e per via di questi contagio all'uomo. Possiamo pensare che avvenga per i pesci, nelle acque, ciò che avviene per l'uomo, nell'ambiente in cui vive: se condizioni favorevoli fan sì che batterî patogeni possano superare le barriere che nello stato normale si oppongono alla loro penetrazione nell'organismo, (per il tegumento esterno, per l'epitelio delle mucose specie respiratoria, per l'attività dello stomaco, etc.), allora ci pare sempre possibile, come nell'uomo così nei pesci, trovandosi l'animale nello stato di recettività al dato batterio, la conseguente infezione, locale o generale, e quindi il timore di un probabile contagio all'uomo per via di pesci infetti; ques'ò ci sembra tanto più ammissibile quando vediamo che un batterio patogeno per gli animali a sangue caldo è anche patogeno per i pesci, e che coltivato nei tessuti di questi conserva la sua virulenza primitiva.

Sarebbe utile in questo senso conoscere dei batterî patogeni per l'uomo e che possano trovarsi, in date condizioni, nelle acque qua-

li, oltre quelli da noi studiati, superate le barriere che si oppongono alla loro penetrazione nell'organismo, possano vivere nei pesci, trovandovi condizioni favorevoli di vita nei tessuti, e infettarli.

Ed i risultati ottenuti intorno alla vitalità ed all'azione di taluni microbi nei pesci ci fan ritenere, che nella esatta biologia dei microrganismi, la quale deve servire di base alla esatta classificazione di essi, son necessarie ulteriori ricerche tendenti a dimostrare l'azione che i diversi microbi, pure non patogeni per gli animali superiori, ed esistenti numerosi nell'aria e nelle acque, possono esercitare nei varî esseri, anche inferiori, che vivono negli stessi mezzi ambienti.

Palermo luglio 1892.

